

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No  
PCT/MX98/00010

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC(6) : C12N 15/82, 5/04, A01H 5/00, 5/10, 4/00, C12P 21/06  
US CL : 536/23.1, 23.7, 435/69.1, 410, 418, 419; 800/278

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

U.S. : 536/23.1, 23.7; 435/69.1, 410, 418, 419; 800/278

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

MEDLINE, AGRICOLA, BIOSIS, APS, WIPDS

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	DE LA FUENTE et al. Aluminium Tolerance in Transgenic Plants by Alteration of Citrate Synthesis. Science. 06 June 1997, Vol. 276, No. 5318, pages 1566-1568, see entire content.	1-6, 8-21, 23-25, 27-29, 35-43, 45, 53
Y	DONALD et al. Cloning, Sequencing, and Expression of the Gene for NADH-Sensitive Citrate Synthase of Pseudomonas Ac ruginosa. J. Bacteriol. October 1989, Vol. 171, No.10, pages 5542-5550, see entire content.	1-58

 Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	
*A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	*T* later documents published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
*B* earlier documents published on or after the international filing date	*X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
*C* document which may throw doubt on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	*Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
*D* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	*E* document; member of the same patent family
*P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
29 APRIL 1999	02 JUL 1999

Name and mailing address of the ISA/US Commissioner of Patents and Trademarks Box PCT Washington, D.C. 20231 Facsimile No. - (703) 305-3230	Authorized officer J. Lawrence OUSAMA M-FAIZ ZAGHMOUT Telephone No. (703) 308-0196
---	---

## PATENT COOPERATION TREATY

PCT

NOTICE INFORMING THE APPLICANT OF THE  
COMMUNICATION OF THE INTERNATIONAL  
APPLICATION TO THE DESIGNATED OFFICES

(PCT Rule 47.1(c), first sentence)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

PAREDES LOPEZ, Octavio  
Km. 9.6 Libramiento Norte  
Carretera Irapuato/León  
Apartado Postal 629  
Irapuato, Guanajuato 36500  
MEXIQUE

Date of mailing (day/month/year) 09 December 1999 (09.12.99)			
Applicant's or agent's file reference		IMPORTANT NOTICE	
International application No. PCT/MX98/00020	International filing date (day/month/year) 29 May 1998 (29.05.98)	Priority date (day/month/year)	
Applicant CENTRO DE INVESTIGACION Y ESTUDIOS AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL et al			

1. Notice is hereby given that the International Bureau has communicated, as provided in Article 20, the international application to the following designated Offices on the date indicated above as the date of mailing of this Notice:  
AU,EP,US

In accordance with Rule 47.1(c), third sentence, those Offices will accept the present Notice as conclusive evidence that the communication of the international application has duly taken place on the date of mailing indicated above and no copy of the international application is required to be furnished by the applicant to the designated Office(s).

2. The following designated Offices have waived the requirement for such a communication at this time:  
AP,BR,CA,MX,NZ

The communication will be made to those Offices only upon their request. Furthermore, those Offices do not require the applicant to furnish a copy of the international application (Rule 49.1(a-bis)).

3. Enclosed with this Notice is a copy of the international application as published by the International Bureau on 09 December 1999 (09.12.99) under No. WO 99/63100

## REMINDER REGARDING CHAPTER II (Article 31(2)(a) and Rule 54.2)

If the applicant wishes to postpone entry into the national phase until 30 months (or later in some Offices) from the priority date, a demand for international preliminary examination must be filed with the competent International Preliminary Examining Authority before the expiration of 19 months from the priority date.

It is the applicant's sole responsibility to monitor the 19-month time limit.

Note that only an applicant who is a national or resident of a PCT Contracting State which is bound by Chapter II has the right to file a demand for international preliminary examination.

## REMINDER REGARDING ENTRY INTO THE NATIONAL PHASE (Article 22 or 39(1))

If the applicant wishes to proceed with the international application in the national phase, he must, within 20 months or 30 months, or later in some Offices, perform the acts referred to therein before each designated or elected Office.

For further important information on the time limits and acts to be performed for entering the national phase, see the Annex to Form PCT/IB/301 (Notification of Receipt Copy) and Volume II of the PCT Applicant's Guide.

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland	Authorized officer J. Zahra
Facsimile No. (41-22) 740.14.35	Telephone No. (41-22) 338.83.38

## PATENT COOPERATION TREATY

From the INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

To: OCTAVIO PAREDES LOPEZ  
 KM.9.6 LIBRAMIENTO NORTE CARRETERA  
 IRAPUATO/LEON  
 APARTADO POSTAL 629  
 IRAPUATO,GTO,MEXICO 36500

PCT

NOTIFICATION OF TRANSMITTAL OF  
 THE INTERNATIONAL SEARCH REPORT  
 OR THE DECLARATION

(PCT Rule 44.1)

Date of Mailing  
 (day/month/year)

02 JUL 1999

Applicant's or agent's file reference  
 000000000000

FOR FURTHER ACTION See paragraphs 1 and 4 below

International application No.  
 PCT/MX98/00020International filing date  
 (day/month/year)

29 MAY 1998

Applicant

CENTRO DE INVESTIGACION Y ESTUDIOS AVANZADOS DEL

1.  The applicant is hereby notified that the international search report has been established and is transmitted herewith.

Filing of amendments and statement under Article 19:

The applicant is entitled, if he so wishes, to amend the claims of the international application (see Rule 46):

When? The time limit for filing such amendments is normally 2 months from the date of transmittal of the international search report; however, for more details, see the notes on the accompanying sheet.

Where? Directly to the International Bureau of WIPO

34, chemin des Colombettes

1211 Geneva 20, Switzerland

Facsimile No.: (41-22) 740.14.35

For more detailed instructions, see the notes on the accompanying sheet.

2.  The applicant is hereby notified that no international search report will be established and that the declaration under Article 17(2)(e) to that effect is transmitted herewith.3.  With regard to the protest against payment of (an) additional fee(s) under Rule 40.2, the applicant is notified that: the protest together with the decision thereon has been transmitted to the International Bureau together with the applicant's request to forward the texts of both the protest and the decision thereon to the designated Offices. no decision has been made yet on the protest; the applicant will be notified as soon as a decision is made.

4. Further action(s): The applicant is reminded of the following:

Shortly after 18 months from the priority date, the international application will be published by the International Bureau. If the applicant wishes to avoid or postpone publication, a notice of withdrawal of the international application, or of the priority claim, must reach the International Bureau as provided in rules 90 bis 1 and 90 bis 3, respectively, before the completion of the technical preparations for international publication.

Within 19 months from the priority date, a demand for international preliminary examination must be filed if the applicant wishes to postpone the entry into the national phase until 30 months from the priority date (in some Offices even later).

Within 20 months from the priority date, the applicant must perform the prescribed acts for entry into the national phase before all designated Offices which have not been elected in the demand or in a later election within 19 months from the priority date or could not be elected because they are not bound by Chapter II.

Name and mailing address of the ISA/US  
 Commissioner of Patents and Trademarks  
 Box PCT  
 Washington, D.C. 20231  
 Facsimile No. (703) 305-3230

Authorized Officer  
 OUKAMA M-FAIZ ZAGHMOU  
 Telephone No. (703) 308-0196

10M  
09/10/589  
16C1

## PATENT COOPERATION TREATY

PCT

NOTIFICATION CONCERNING  
AMENDMENTS OF THE CLAIMS(PCT Rule 62 and  
Administrative Instructions, Section 417)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

Commissioner  
US Department of Commerce  
United States Patent and Trademark  
Office, PCT  
2011 South Clark Place Room  
CP2/5C24  
Arlington, VA 22202  
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

in its capacity as International Preliminary Examining Authority

Date of mailing (day/month/year)  
08 March 2001 (08.03.01)

International application No.  
PCT/MX98/00020

International filing date (day/month/year)  
29 May 1998 (29.05.98)

Applicant

CENTRO DE INVESTIGACION Y ESTUDIOS AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITECNICO  
NACIONAL et al16  
TECH CENTER 1600/2900

JUL 02 2001

RECEIVED

The International Bureau hereby informs the International Preliminary Examining Authority that no amendments under Article 19 have been received by the International Bureau (Administrative Instructions, Section 417).

The International Bureau of WIPO  
34, chemin des Colombettes  
1211 Geneva 20, Switzerland

Facsimile No. (41-22) 740.14.35

Authorized officer

MVC  
Maria Victoria CORTIELLO

Telephone No. (41-22) 338.83.38

003886076

## PATENT COOPERATION TREATY

091701589

PCT

NOTIFICATION OF ELECTION  
(PCT Rule 61.2)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

Commissioner  
US Department of Commerce  
United States Patent and Trademark  
Office, PCT  
2011 South Clark Place Room  
CP2/5C24  
Arlington, VA 22202  
ETATS-UNIS D'AMERIQUE  
in its capacity as elected Office

Date of mailing (day/month/year) 08 March 2001 (08.03.01)	
International application No. PCT/MX98/00020	Applicant's or agent's file reference
International filing date (day/month/year) 29 May 1998 (29.05.98)	Priority date (day/month/year)
Applicant HERRERA ESTRELLA, Luis Rafael	

1. The designated Office is hereby notified of its election made:

in the demand filed with the International Preliminary Examining Authority on:

29 December 1999 (29.12.99)

in a notice effecting later election filed with the International Bureau on:

\_\_\_\_\_

2. The election  was

was not

made before the expiration of 19 months from the priority date or, where Rule 32 applies, within the time limit under Rule 32.2(b).

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland Facsimile No.: (41-22) 740.14.35	Authorized officer Maria Victoria CORTIELLO Telephone No.: (41-22) 338.83.38
---	--

## PATENT COOPERATION TREATY

PCT

NOTIFICATION OF ELECTION  
(PCT Rule 61.2)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

Commissioner  
US Department of Commerce  
United States Patent and Trademark  
Office, PCT  
2011 South Clark Place Room  
CP2/5C24  
Arlington, VA 22202  
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

in its capacity as elected Office

Date of mailing (day/month/year) 09 March 2001 (09.03.01)	To:
International application No. PCT/MX98/00020	Applicant's or agent's file reference
International filing date (day/month/year) 29 May 1998 (29.05.98)	Priority date (day/month/year)
Applicant HERRERA ESTRELLA, Luis Rafael	

1. The designated Office is hereby notified of its election made:

in the demand filed with the International Preliminary Examining Authority on:

29 December 1999 (29.12.99)

in a notice effecting later election filed with the International Bureau on:

\_\_\_\_\_

2. The election  was

was not

made before the expiration of 19 months from the priority date or, where Rule 32 applies, within the time limit under Rule 32.2(b).

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland Facsimile No.: (41-22) 740.14.35	Authorized officer Maria Victoria CORTIELLO Telephone No.: (41-22) 338.83.38
---	--

Oficina Nacional de  
SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACION  
EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

<p>(51) Clasificación Internacional de Patentes:</p> <p>C12N 15/82, 5/04, A01H 5/00, 5/10, 4/00, C12P 21/06</p>	<p>A1</p>	<p>(11) Número de publicación internacional: <b>WO 99/63100</b></p> <p>(43) Fecha de publicación internacional: 9 de Diciembre de 1999 (09.12.99)</p>
<p>(21) Solicitud internacional: PCT/MX98/00020</p> <p>(22) Fecha de la presentación internacional: 29 de Mayo de 1998 (29.05.98)</p> <p>(71) Solicitante (<i>para todos los Estados designados salvo US</i>): CENTRO DE INVESTIGACION Y ESTUDIOS AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL [MX/MX]; Km. 9.6 Libramiento Norte Carretera Irapuato/León, Apartado Postal 629, Irapuato, Guanajuato 36500 (MX).</p> <p>(72) Inventor; e</p> <p>(75) Inventor/solicitante (<i>sólo US</i>): HERRERA ESTRELLA, Luis Rafael [MX/MX]; Bugambilias 241, Fraccionamiento Espaňita, Irapuato, Guanajuato 36610 (MX).</p> <p>(74) Mandatario: PAREDES LOPEZ, Octavio; Km. 9.6 Libramiento Norte Carretera Irapuato/León, Apartado Postal 629, Irapuato, Guanajuato 36500 (MX).</p>		<p>(81) Estados designados: AU, BR, CA, MX, NZ, US, Patente ARIPO (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), Patente europea (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).</p> <p><b>Publicada</b> <i>Con informe de búsqueda internacional.</i></p>

(54) Title: PROCESS FOR OBTAINING TRANSGENIC PLANTS WHICH HAVE AN IMPROVED CAPACITY FOR THE UPTAKE OF NUTRIENTS AND TOLERANCE TO TOXIC COMPOUNDS WHICH ARE PRESENT IN THE SOIL

(54) Título: METODO PARA LA OBTENCION DE PLANTAS TRANSGENICAS QUE TIENEN UNA CAPACIDAD MEJORADA PARA LA TOMA DE NUTRIENTES Y LA TOLERANCIA A COMPUESTOS TOXICOS PRESENTES EN EL SUELO

**(57) Abstract**

The invention relates to a process for obtaining through genetic engineering plants with an improved capacity to synthesize, accumulate and exudate organic acids. More specifically, it relates to the generation of transgenic plants which have an improved capacity for the production and excretion of organic acids, providing them with an improved capacity to absorb natural nutrients for the soil or added nutrients such as fertilizers. Said plants have also an incremented capacity to tolerate the presence in the soil of certain toxic compounds such as aluminium. The transformation process implies the introduction of genes which increase the capacity of the plant to produce organic acids and comprises the following steps: a) preparation of a recombinant molecule comprising the coding sequence for an enzyme which produces organic acids, functionally ligated to a promoter sequence which is active in vegetable cells and a terminator of the functional transcription in vegetable cells; b) transformation of vegetable cells with said construction; c) regeneration of transgenic plants from transformed cells.

**(57) Resumen**

Esta invención se refiere a un método para la obtención por técnicas de ingeniería genética de plantas mejoradas en su capacidad de sintetizar, acumular y exudar ácidos orgánicos. Más específicamente se refiere a la generación de plantas transgénicas que tienen una capacidad mejorada de producir y excretar ácidos orgánicos, lo que les permite una mejor capacidad de absorción de nutrientes naturales del suelo o adicionados como fertilizantes a los suelos. Estas plantas tienen también una capacidad incrementada de tolerar la presencia en el suelo de ciertos compuestos tóxicos como es el aluminio. El método de transformación implica la introducción de genes que incrementa la capacidad de la planta para producir ácidos orgánicos y comprende los siguientes pasos: a) preparación de una molécula recombinante que comprenda la secuencia codificante para una enzima que produce ácidos orgánicos, funcionalmente ligados a una secuencia promotora activa en células vegetales y un terminador de la transcripción funcional en células vegetales; b) transformación de células vegetales con dicha construcción; c) la regeneración de plantas transgénicas a partir de las células transformadas.

**UNICAMENTE PARA INFORMACION**

Códigos utilizados para identificar a los Estados parte en el PCT en las páginas de portada de los folletos en los cuales se publican las solicitudes internacionales en el marco del PCT.

AL	Albania	ES	España	LS	Lesotho	SI	Eslavonia
AM	Armenia	FI	Finlandia	LT	Lituania	SK	Eslavaquia
AT	Austria	FR	Francia	LU	Luxemburgo	SN	Senegal
AU	Australia	GA	Gabón	LV	Letonia	SZ	Swazilandia
AZ	Azerbaiyán	GB	Reino Unido	MC	Mónaco	TD	Chad
BA	Bosnia y Herzegovina	GE	Georgia	MD	República de Moldova	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagascar	TJ	Tayikistán
BE	Bélgica	GN	Guinea	MK	Ex República Yugoslava de Macedonia	TM	Turkmenistán
BF	Burkina Faso	GR	Grecia	ML	Malí	TR	Turquía
BG	Bulgaria	HU	Hungría	MN	Mongolia	TT	Trinidad y Tabago
BJ	Benín	IE	Irlanda	MR	Mauritania	UA	Ucrania
BR	Brasil	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarús	IS	Islandia	MX	México	US	Estados Unidos de América
CA	Canadá	IT	Italia	NE	Níger	UZ	Uzbekistán
CF	República Centroafricana	JP	Japón	NL	Países Bajos	VN	Viet Nam
CG	Congo	KE	Kenya	NO	Noruega	YU	Yugoslavia
CH	Suiza	KG	Kirguistán	NZ	Nueva Zelanda	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	República Popular Democrática de Corea	PL	Polonia		
CM	Camerún	KR	República de Corea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kazakstán	RO	Rumania		
CU	Cuba	LC	Santa Lucía	RU	Federación de Rusia		
CZ	República Checa	LI	Liechtenstein	SD	Sudán		
DE	Alemania	LK	Sri Lanka	SE	Suecia		
DK	Dinamarca	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estonia						

**Método para la obtención de plantas transgénicas que tienen una capacidad mejorada para la toma de nutrientes y la tolerancia a compuestos tóxicos presentes en el suelo.**

5

**Antecedentes de la invención.**

La invención se refiere a un método para la obtención de plantas transgénicas que tienen una elevada capacidad para sintetizar y exudar ácidos orgánicos cuando se comparan con plantas no transformadas equivalentes, una 10 molécula de ADN para producir dichas plantas transgénicas, las plantas transgénicas con capacidad incrementada de síntesis y exresión de ácidos orgánicos y los usos de las plantas transgénicas.

Existen al menos 17 elementos minerales que son esenciales para el crecimiento y desarrollo de las plantas. Los elementos que se han descrito incluyen 15 al C,H,O,N,K,P,Mg,Ca,S,Fe,B,Mn,Cu,Zn,Mo,Cl y Ni, algunos de ellos, los micronutrientes, como por ejemplo el molibdeno, se requieren a concentraciones menores a una parte por millón, pero si están ausentes la planta no puede completar su ciclo de vida. Otros nutrientes como el nitrógeno y el fósforo (los macronutrientes) se necesitan en niveles elevados y llegan a alcanzar 20 concentraciones de hasta el 3% del peso seco total de la planta (Crawford,N.M (1994). En *Arabidopsis*. Cold Spring Harbor Press pp. 1119-1145).

El nitrógeno, fósforo y Fierro, son con mayor frecuencia los nutrientes que limitan el rendimiento de los cultivos. Estos elementos además de nutrientes esenciales, actúan como señales ambientales que pueden modificar dramáticamente 25 la fisiología y desarrollo de las plantas, por ejemplo, alterando la tasa de crecimiento y ramificación de la raíz de acuerdo a la concentración extracelular de estos iones o activando la expresión de genes específicos tales como transportadores y reductasas (Goldstein, A.H (1991).Theor. Appl. Genet. 82:191-104 ).

30 Cada nutriente tiene propiedades particulares que afectan su disponibilidad y su captación por la planta, así por ejemplo, aunque el P y el Fe pueden estar en concentraciones adecuadas en el suelo, pueden encontrarse en el suelo en formas insolubles, no disponibles para ser tomados y utilizados por las plantas. La disponibilidad de P y Fe depende del pH del suelo. El fierro se precipita cuando se 35 combina con iones hidróxilo y el fósfato sale de solución uniéndose fuertemente al Ca y Mg en suelos con pH alcalino o al Mn, Fe y Al en suelos ácidos.

Para resolver el problema de la falta de nutrientes en el suelo en forma asimilable para la plantas, se ha recurrido a la aplicación intensiva de fertilizantes, en cuya producción se gastan tan sólo en los Estados Unidos alrededor de 10 billones de dólares cada año (Glass, A. D.H (1989) *Plant nutrition: An*

5 *introduction to current concepts.* Jones an Bartlett, Boston, Massachusetts). En todo el mundo se suministran a los cultivos más de 140 millones de toneladas de nitrógeno, fósforo y potasio. Sin embargo, solo una pequeña parte de éstos se aprovecha y el resto se pierde por diversas razones. Por ejemplo, en suelos ácidos una gran parte del P suministrado a los cultivos como fertilizante reacciona con 10 moléculas de Fe y Al formando compuestos insolubles no aprovechables, en el proceso llamado fijación de fosfato al suelo. En un estudio reciente se ha propuesto que hasta el 80% del fósforo en el suelo permanece indisponible para la planta debido a fenómenos de adsorción, precipitación y conversión a formas orgánicas (Holford I.C.R. (1997). *Aust.J.Soil Res.* 35:227-239).

15 15 De los fertilizantes usados en el mundo una buena parte se pierde por lavado del suelo durante la época de lluvias llegando hasta los cuerpos de agua y convirtiéndose en un problema de contaminación muy serio.

Debido a este último problema, el énfasis puesto inicialmente en la nutrición vegetal para maximizar la producción ha cambiado con la intención de 20 minimizar las emisiones de nutrientes al ambiente (Manneje,L. (1994). *In Grassland and Society.* Manneje and Frame. Wageningen Press, Wageningen). Por ejemplo, el Gobierno de Holanda ha promulgado leyes que entraron en vigor a partir de enero de 1998 tendientes a limitar el uso del Nitrógeno y del Fósforo, la aplicación de estos elementos estará sujeta a un monitoreo estricto del estado 25 nutricional de los suelos para mantener la producción de los cultivos con la aplicación mínima de fertilizantes. Para varios países europeos el desarrollo de cultivares con alta eficiencia nutricional es una necesidad urgente para disminuir el efecto negativo que han tenido las prácticas agrícolas sobre los ecosistemas (Loneragan, J. F (1997). *Plant and Soil* 196:163-174).

30 30 Para enfrentar el problema de la incapacidad de la mayoría de las plantas de tomar nutrientes no disponibles del suelo, algunos tratamientos han sido desarrollados, como es la adición de ácidos orgánicos (ver patente: US Pat 5,593,947; Enero, 14 de 1997), la adición de nutrientes quelados (ver patente: EPO Pat 0 284 339; 22 de Marzo de 1988) o la inoculación con microorganismos 35 que solubilizan nutrientes (ver patente: US Pat 5,026,417; Enero 25, de 1991).

que si bien pueden ser efectivos resultan costosos y se requieren de repetir todos los años.

Por lo tanto, es de suma importancia el desarrollo de plantas transgénicas con una mayor eficiencia de toma de los nutrientes que existen en el suelo o de aquellos que son aplicados en forma de fertilizantes.

De poderse obtener dichas plantas, como es demostrado en esta invención, en el caso directo del Fósforo se vislumbran dos grandes aplicaciones: 1) La explotación efectiva de las reservas de Fósforo en suelos afectados por el pH, en los cuales este nutriente no está disponible para las plantas; 2) Alcanzar los requerimientos de fosfato para los cultivos con una aplicación menor de fertilizantes.

Las raíces de las plantas excretan una gran variedad de iones y sustancias orgánicas que afectan la disponibilidad de nutrientes en el suelo. La síntesis y exudación de compuestos quelantes (ácidos orgánicos y fitoquelatinas) han sido propuestos como un mecanismo que facilita la captación de diferentes elementos, por ejemplo P, Fe, Mn y Zn (Marschner, H. (1995) *Mineral nutrition of higher plants*. Academic Press, San Diego, CA). En el contexto de la presente invención la exudación y exresión se consideran funcionalmente el mismo proceso, que definimos como el proceso mediante el cual las plantas, a través de sus raíces, envían compuestos orgánicos e inorgánicos al suelo.

La naturaleza química de las sustancias que se excretan por la raíz depende de varios factores: la especie, la variabilidad genética, la edad de la planta y el estado nutricional de la misma. Los componentes que se han identificado en los exudados de raíz se pueden incluir en dos grandes grupos: sustancias mucilaginosas y solutos orgánicos. Los solutos orgánicos incluye azúcares, ácidos orgánicos, aminoácidos y compuestos fenólicos.

Los ácidos orgánicos son moléculas muy versátiles que toman parte en diferentes procesos fisiológicos en todos los organismos vivos incluyendo las plantas. La biosíntesis de estos compuestos parece ser un fenómeno general que se encuentra conservado en los seres vivos, aunque en los animales se conoce a detalle su participación como precursores de vías metabólicas importantes como el ciclo de Krebs o el ciclo del glicoxilato, su mecanismo de transporte y las enzimas con las que interactúan, en las plantas se tiene muy poca información al respecto (Srere, P.A. (1992). *Curr. Top. Cell. Reg.* 33:261-275).

La exresión de ácidos orgánicos ha sido correlacionada con la capacidad de algunas especies vegetales, como la colza (*Brassica napus*) y el lupino blanco

(*Lupinus albus*), de solubilizar fosfato (y por lo tanto, convertir el fosfato en formas biológicamente asimilables), a partir de compuestos insolubles como los fósfatos de Aluminio o Fierro, o de la roca fosfórica. En ambos casos un incremento en la exudación de ácidos orgánicos es observada como respuesta a un 5 estrés causado por la falta de fosfato (Hoffland et al. (1989) Plant and Soil 113:161-165). Basados en estos estudios se ha propuesto que la exudación natural de ácidos orgánicos por *Brasica napus*, es una estrategia efectiva para incrementar la toma de fosfato a partir de roca fosfórica. En el caso de *Lupinus albus*, en condiciones de baja disponibilidad de fosfato, se induce la formación de 10 raíces especializadas, que han sido denominadas raíces proteoídes, que exudan una gran cantidad de ácido cítrico, lo que le permite a esta especie vegetal la solubilización de fosfato a partir de compuestos insolubles como el fosfato de Fierro o Aluminio.

Además de la correlación observada entre la capacidad de ciertas especies 15 vegetales de solubilizar fosfato y su capacidad de exudar ácidos orgánicos, especialmente ácido cítrico, desde los años 50 se conoce que los ácidos orgánicos, como citrato, malato, oxalato, tartrato, malonato y lactato son capaces de disolver los fósfatos de Aluminio y Fierro que normalmente son insolubles. De todos los 20 ácidos orgánicos antes mencionados, el citrato parece ser el más efectivo para disolver compuestos insolubles de fosfato.

Otro problema importante que afecta la toma de nutrientes del suelo es la presencia de compuestos tóxicos, como ciertas formas de Aluminio soluble u otros metales que pueden interferir con el crecimiento de la raíz.

El Aluminio (Al), es el metal más abundante sobre la capa terrestre 25 (representando aproximadamente el 7% de su masa) y se encuentra en el suelo principalmente en forma de silicatos y óxidos de Aluminio insolubles. Sin embargo, cuando es solubilizado en suelos ácidos (principalmente en forma de Al<sup>+3</sup>), el Aluminio es altamente tóxico para muchos cultivos. La toxicidad por Al se considera como el principal factor que limita la productividad vegetal en los 30 suelos ácidos. La acidificación de los suelos ocurre en forma natural cuando los cationes básicos son arrastrados del suelo, pero también puede ser acelerada considerablemente por ciertas prácticas agrícolas y por la lluvia ácida. Los suelos ácidos comprenden aproximadamente el 40% de la superficie arable del mundo y son particularmente abundantes en las regiones tropicales y subtropicales del 35 mundo (Foy,CD. et al. (1978). Annu.Rev.Plant Physiol. 29: 511-66).

Una práctica común para sostener la productividad agrícola en los suelos ácidos, es la aplicación de hidróxido de calcio (lime) ó sulfato de calcio (*gypsum*,  $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) para incrementar el pH del suelo (ver por ejemplo la patente US Pat. 5,628,811; 13 de Mayo de 1997). Aunque este tipo de tratamientos del suelo han tenido éxito, no representa una solución viable para muchos agricultores debido a que no cuentan con los recursos económicos para aplicarlo, además de que su aplicación propicia efectos indeseables tales como la contaminación de ríos.

En las plantas, el Al produce síntomas tóxicos generales que son similares a deficiencias nutrimentales (Bennet, RJ et al. (1986). *J. Plant Soil.* 3: 11-17.). El decrecimiento en la nutrición mineral parece deberse principalmente a la inhibición del crecimiento de la raíz de la planta ocasionado por la acción del Aluminio sobre la punta de la raíz (Ryan, PR et al. (1993). *J. Exp. Bot.* 44: 437-446). La presencia de Al en concentraciones del orden micromolar en soluciones nutritivas sencillas puede inhibir el crecimiento de las raíces en pocos minutos .

Diferentes estudios han mostrado que existe una considerable variabilidad genética inter e intraespecies respecto de la tolerancia vegetal a la toxicidad por Al (Baligar, VC et al. (1993). *Plant and Soil.* 150: 271-277.). Aunque se han propuesto diferentes hipótesis para explicar las diferencias genotípicas que dan origen a plantas tolerantes al Al, la evidencia sugiere fuertemente que en diferentes especies vegetales la tolerancia se origina vía la exclusión del Aluminio de la punta de la raíz (Delhaize, E et al. (1993). *Plant Physiology.* 103: 685-693.). Se ha observado, por ejemplo, que los cultivares de Trigo susceptibles acumulan de 3 a 8 veces más Aluminio que los cultivares tolerantes en el ápice de la raíz. (Tice, KR. Et al. (1992). *Plant Physiol.* 100: 309-318).

La tolerancia a Al en Trigo (*Triticum sp*), Maíz (*Zea mayz*) y Haba (*Vicia faba* L.) se ha correlacionado con un incremento en su capacidad de excretar ácidos orgánicos, tales como el ácido málico y el ácido cítrico (Miyasaka SC et al. (1991). *Plant Physiology.* 91: 737-743; Delhaize E et al. (1993). *Plant Physiology.* 103: 695-702). Se ha propuesto que los ácidos orgánicos excretados confieren tolerancia al formar complejos con el  $\text{Al}^{+3}$  fuera de la membrana plasmática, previniendo así su ingreso (Miyasaka SC et al. (1991). *Plant Physiology.* 91: 737-743).

De acuerdo con el papel propuesto para los ácidos orgánicos como agentes quelantes que previenen la toxicidad por Aluminio, se ha demostrado que la adición de ácidos orgánicos, tales como el cítrico y el málico a la solución nutritiva donde son crecidas las plantas, disminuyen significativamente el efecto tóxico del

Aluminio. Estos experimentos también han mostrado que el ácido cítrico es más efectivo que el succinato o el malato para revertir la toxicidad por Al (Hue, NV et al. (1986). Soil.Sci.Soc. ActJ. 50 : 28-34; Barlett, RJ. and Riego, DC. (1972). Plant Soil. 37: 419-423.).

5 La afinidad del citrato por cationes importantes biológicamente se conoce desde hace varios años. En estudios pioneros dirigidos por D.H. Sieling de la Universidad de Massachusetts, se comparó el efecto de varias sustancias que forman parte de la materia orgánica del suelo para evitar la precipitación del Fosfato ocasionada por Fierro y Aluminio. Entre los resultados obtenidos en estos  
10 trabajos, se encontró que el citrato se une fuertemente al Fierro y Aluminio evitando la precipitación del Fosfato a distintos valores de pH, esta interacción fue más eficiente comparada al efecto promovido por otros ácidos orgánicos. En la reacción mencionada, un milimol de citrato se combina con un milimol de Aluminio disminuyendo hasta en un 100% la precipitación del Fosfato en un rango  
15 de 4.0-9.0 unidades de pH.

Se ha sugerido que la efectividad del citrato para interactuar con cationes, está determinada principalmente por las cargas negativas presentes en su estructura, las cuales promueven la formación de complejos organometálicos altamente estables.

20 Evidencia reciente sugiere que los ácidos orgánicos, especialmente el citrato, desempeñan un papel fundamental en la tolerancia de las plantas a toxicidad por Aluminio (Miyasaka et al. (1991). Plant Physiology 96:737-743. De la fuente et al. (1997) Science 276:1566-1568) y metales pesados (Yang et al. (1997) Plant and Soil 196:271-176), así como en la captación de nutrientes tales  
25 como el Fósforo, el Fierro y el Níquel (Jones, D. L. and P.R. Darrah (1994) Plant and Soil 166:247-257).

Las enzimas que sintetizan ácidos orgánicos y los genes que las codifican han sido ampliamente estudiados en bacterias y animales. Entre las más estudiadas están la citrato sintasa y la malato deshidrogenasa, que han sido caracterizadas en  
30 mucho detalle y los genes que las codifican de un número importante de bacterias, animales y algunas plantas han sido aislados y secuenciados. Para el caso de la Citrato Sintasa más de 300 genes han sido clonados y caracterizados, mientras que para la Malato Deshidrogenasa más de 500 genes han sido clonados y secuenciados.

35 La citrato sintasa, cataliza la síntesis de citrato mediante la condensación del grupo metilo del acetil coenzima A y el grupo carbonilo del oxalacetato. De esta

enzima se conocen los aminoácidos que forman el sitio activo, los cuales están conservados en todas las enzimas analizadas incluyendo las de *Rickettsia* y *Arabidopsis* (Alter et al. (1990). *Biochemistry*. 29:7557-7563). Las citrato sintasas de las bacterias gram negativas *Escherichia coli*, *Acinetobacter anitratum* 5 y *Pseudomonas aeruginosa*, son enzimas alóstéricas cuya actividad se inhibe fuertemente por NADH y comparten una homología de alrededor del 75% en su secuencia de aminoácidos (Alter et al. (1990). *Biochemistry*. 29:7557-7563).

En las plantas se han identificado dos isosformas de la Citrato Sintasa, una 10 que se localiza en la mitocondria y otra presente en el glioxisoma. El análisis de los ADN complementarios que codifican para las enzimas mitocondriales de *Arabidopsis thaliana* y Papa (*Solanum tuberosum*), mostraron homología con las enzimas de cerdo y levaduras, en tanto que la citrato sintasa del glioxisoma de Pepino parece estar más relacionada a sus contrapartes bacterianas. Ambas 15 isosformas son distintas inmunológicamente y al parecer no están sujetas a regulación alóstérica (Kato et al. (1995). *Plant Mol. Bio.* 27:377-390).

La factibilidad de producir plantas transgénicas que expresan genes foráneos ha sido demostrada ampliamente. Se ha logrado la expresión de genes tanto de origen vegetal, como bacteriano, viral y animal.

Existen diferentes métodos de transformación genética para la obtención de 20 células transgénicas a partir de las cuales se pueden regenerar plantas transgénicas fértiles. Entre estos métodos se pueden destacar la electroporación de protoplastos o tejidos intactos, el co-cultivo de células o tejidos intactos con cepas de *Agrobacterium tumefaciens* y el bombardeo con microparticulas o biolística.

Nosotros hemos demostrado que es posible transformar genéticamente 25 ciertas plantas para darles una mayor capacidad de sintetizar, acumular y exudar ácidos orgánicos. La invención entonces provee de un método para obtener plantas transgénicas con una capacidad aumentada de sintetizar y exudar ácidos orgánicos, que comprende los siguientes pasos

- a) La preparación de una construcción genética que comprenda una o más 30 enzimas que sinteticen ácidos orgánicos, funcionalmente ligadas a una secuencia promotora de la transcripción activa en plantas y una secuencia terminadora de la transcripción activa en células vegetales;
- b) La transformación de células vegetales con la construcción genética anterior; y
- 35 c) La regeneración de plantas transgénicas a partir de las células transformadas.

### Descripción de la invención

Reconociendo la importancia que tiene la disponibilidad de nutrientes en el suelo para la producción agrícola, y que muchos de los nutrientes presentes en el suelo o agregados durante las prácticas agronómicas como fertilizantes se convierten en formas insolubles no disponibles para la nutrición, crecimiento y productividad de las plantas, ha sido desde hace mucho tiempo altamente deseable la obtención de plantas con una mejor capacidad de aprovechar los nutrientes no disponibles del suelo. Era entonces deseable la aplicación de las técnicas de ADN recombinante e Ingeniería Genética para la producción de plantas con una capacidad mejorada para la solubilización y absorción de nutrientes del suelo a partir de compuestos insolubles o poco disponibles para las plantas.

Dado que existe evidencia que demuestra o al menos sugiere fuertemente que los ácidos orgánicos facilitan la disolución y absorción de nutrientes, especialmente fósforo y fierro, a partir de compuestos insolubles o poco disponibles para la nutrición de las plantas, es altamente deseable la obtención de plantas transgénicas con una capacidad aumentada para producir y excretar ácidos orgánicos, y que por lo tanto tengan una mayor capacidad para la utilización de nutrientes del suelo.

Aunado a esto, se ha postulado que la exudación de ácidos orgánicos es un mecanismo utilizado por algunas plantas para combatir los efectos tóxicos de algunos elementos presentes en el suelo, como es el caso del aluminio en suelos ácidos. Por lo tanto, las plantas transgénicas que tienen una elevada capacidad para la síntesis de ácidos orgánicos, no solo tienen una mejor capacidad de utilizar nutrientes biológicamente no disponibles en el suelo, sino que también son capaces de tolerar concentraciones tóxicas de algunos elementos como el aluminio.

En la presente invención se describe un método para la obtención de plantas transgénicas con una capacidad incrementada de producción, acumulación y exudación de ácidos orgánicos. En particular la invención se refiere a la sobreproducción de ácido cítrico, sin embargo, la presente invención no se limita a la sobreproducción de ácido cítrico, ya que es posible también la sobreproducción de otros ácidos orgánicos, como son el ácido málico y el ácido oxálico entre otros.

Uno de los aspectos de esta invención, describe la construcción de una molécula de ADN recombinante que codifica la enzima citrato sintasa, funcionalmente ligada a una secuencia promotora de la transcripción funcional en

plantas y una secuencia terminadora de la transcripción de plantas. La presente invención se refiere, pero no se limita, al uso del gen que codifica la Citrato Sintasa, ya que es posible también el uso de otros genes que codifican enzimas que sintetizan otros ácidos orgánicos como aquellas capaces de sintetizar el ácido málico y el ácido oxálico.

En células vegetales, la síntesis de ácido cítrico ocurre primordialmente en la mitocondria, donde es la primera reacción del ciclo de Krebs y es llevada a cabo por la citrato sintasa. Ya que esta reacción es parte de un ciclo complejo, donde el flujo de esqueletos carbonados no necesariamente se acumula en uno solo de sus componentes y está sujeto a complejos mecanismos de regulación, es altamente deseable para llevar a cabo la invención, compartimentalizar la enzima citrato sintasa en un compartimento subcelular distinto a la mitocondria, para evitar que las moléculas de ácido cítrico sintetizado se conviertan en otros de los componentes del ciclo de Krebs. Por lo tanto, un aspecto importante de esta invención es la descripción de un método para obtención de plantas transgénicas donde la Citrato Sintasa está localizada en un compartimento subcelular distinto a la mitocondria, como son el citoplasma y el cloroplasto. Por ende, la molécula de ADN recombinante descrita en esta invención puede contener un péptido señal o de transito que dirija la Citrato Sintasa a un compartimento discreto de la célula.

La presente invención tiene ventajas sobre la técnica anterior, ya que las plantas transgénicas obtenibles por este método tiene una mejor capacidad de tomar nutrientes o tolerar compuestos tóxicos sin la necesidad de emplear tratamientos químicos del suelo o el uso de nutrientes asociados a compuestos quelantes.

La industria o los agricultores pueden usar las semillas transgénicas para establecer cultivos agrícolas, reduciendo sus costos de producción, en términos de tratamientos del suelo o adición de fertilizantes, o aumentando la productividad de los mismos en suelos ácidos o en aquellos que tienen nutrientes no disponibles.

Parte de esta invención, donde se describe el método para la obtención de plantas transgénicas que sobreproducen citrato y la capacidad aumentada de estas plantas para tolerar concentraciones tóxicas de aluminio, ha sido previamente publicada (De la Fuente et al., Science 276: 1566-1568).

#### **Descripción detallada de la invención.**

La presente invención está dirigida a la obtención de plantas transgénicas con una capacidad incrementada de producción y exudación de ácidos orgánicos.

De acuerdo con uno de los aspectos descritos en esta invención, se describen moléculas recombinantes y métodos que permiten la obtención de plantas transgénicas con una capacidad incrementada de síntesis y exudación de ácidos orgánicos.

5 La forma de ácido orgánico preferido en esta invención es el ácido cítrico, ya que se ha demostrado como uno de los más efectivos para solubilizar y facilitar la absorción de nutrientes del suelo.

En esta invención nos referimos a la Citrato Sintasa como cualquier enzima capaz de sintetizar ácido cítrico. La presente invención se refiere, pero no se limita 10 a la Citrato Sintasa, ya que es posible el uso de otros genes que codifican enzimas capaces de sintetizar otro ácidos orgánicos. La Citrato Sintasa o cualquier otra enzima que sintetiza ácidos orgánicos, debe tener parámetros cinéticos compatibles con los sistemas bioquímicos y fisiológicos de la planta de interés.

El gen o la parte codificante de un gen que codifica enzimas que sintetizan 15 ácidos orgánicos puede ser derivada de una molécula de ADN complementario, de ADN genómico o puede ser sintetizado químicamente total o parcialmente. El gen deseado puede ser obtenido de cualquier microorganismo, de cualquier planta o de cualquier animal.

En general, el gen o parte del mismo será derivado de secuencias nativas 20 de algún organismo. En el caso de las enzimas capaces de sintetizar ácidos orgánicos, y en particular la Citrato Sintasa, un gran número de genes han sido previamente identificados y caracterizados, incluyendo la determinación de su secuencia nucleotídica.

Para lograr que el gen contenido en la molécula de ADN recombinante se 25 exprese en los niveles y en los tejidos adecuados, es deseable, pero no necesario para genes de origen vegetal, que esté contenido en un cassette de expresión que incluya una secuencia promotora de la transcripción funcional en plantas, la parte codificante del gen de la enzima que sintetiza ácidos orgánicos y un terminador de la transcripción funcional en plantas. Adicionalmente se puede incluir una 30 secuencia que codifique para un péptido de tránsito que dirija la enzima a un compartimiento específico de la célula. El péptido de tránsito y las señales de procesamiento correspondientes puede ser derivado de cualquier proteína vegetal que se sintetiza en el citoplasma y es translocada al compartimiento subcelular de interés, ya sea este el plástido o la mitocondria. Por ejemplo, para localizar en los 35 plástidos pueden ser usadas secuencias derivadas de genes que codifican para la subunidad pequeña de la ribulosa bisfósfato carboxilasa o las proteínas CAB que

son aquellas que se unen a las clorofislas a y b para formar las antenas cosechadoras de luz (Van den Broek et al. *Nature* (London) 313, 358-363 (1985)).

Para la localización en el citoplasma de enzimas codificadas por genes 5 bacterianos, no es necesario adicionar ningún péptido de tránsito, ya que al carecer de este tipo de señales permanecerán en el citoplasma de manera natural.

En el caso de enzimas provenientes de eucariontes, si éstas son localizadas en un compartimento subcelular distinto al citoplasma, es necesario remover su péptido de tránsito natural para localizarlas en el citoplasma.

10 En general es deseable el uso de genes que no sean de origen vegetal, por lo tanto es necesario incluir en la molécula de ADN recombinante las secuencias iniciadoras y terminadoras de la transcripción para garantizar la expresión funcional del gen en cuestión.

Para el caso de genes que no son de origen vegetal, en la secuencia 15 iniciadora de la transcripción se debe incluir un promotor y se puede emplear también una señal de inicio de la traducción óptima para plantas o uno de los llamados potenciadores de la traducción. Los promotores que pueden ser usados incluyen promotores de la planta que se desea transformar, promotores de otras plantas o de cualquier origen que sean funcionales en la planta blanco y dirijan una 20 expresión constitutiva, inducible o tejido específica. Por ejemplo, se pueden utilizar promotores derivados del plásmido Ti de *Agrobacterium tumefaciens* como son los promotores de la Octopina Sintetasa, la Nopalina Sintetasa o la Agropina Sintetasa. Además, se pueden incluir otros promotores como el promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor o aquellos derivados de geminivirus.

25 La expresión temporal, inducible o tejido específica puede ser lograda mediante el uso de promotores o secuencias regulatorias que tienen la especificidad de expresión deseada. Aunque hemos encontrado que la invención funciona utilizando promotores constitutivos, podría ser deseable considerar el uso de promotores específicos de raíz o aquellos que se activan por estrés causado por la 30 falta de fosfato o fierro. Por ejemplo, los promotores de los genes que codifican los transportadores de Fosfato, que se ha demostrado que se expresan de manera específica en las células del epitelio de la raíz (Muchhal U.S., et al. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 93: 10519-10523).

La secuenciadora terminadora de la transcripción puede ser derivada del 35 mismo gen de donde se obtuvo la secuencia promotora de la transcripción o de un gen distinto. La secuencia terminadora puede ser derivada de genes contenidos en

el T-DNA del plásmido Ti de *Agrobacterium*, del virus del mosaico de la coliflor o de genes de origen vegetal. Por ejemplo, la secuencia terminadora del gen de la nopalina sintetasa es frecuentemente usado en la Ingeniería Genética de plantas.

La diferentes secuencias de ácidos nucleicos que forman parte de la 5 molécula de ADN recombinante pueden ser unidas por métodos convencionales descritos en la literatura. La secuencias deben ser clonadas y unidas en la orientación y orden correcto para lograr la expresión funcional en células vegetales.

De acuerdo con uno de los aspectos de esta invención, las plantas de 10 interés son transformadas con una molécula de ADN recombinante que codifica al menos una enzima capaz de sintetizar ácidos orgánicos. En el desarrollo de la molécula recombinante, las diferentes secuencias nucleotídicas que la componen y que comprenden las secuencias regulatorias de la transcripción y la secuencia codificante de interés, pueden haber sido sujetas a diferentes tipos de 15 procesamiento, como son ligaciones, digestiones con enzimas de restricción, mutagénesis *in vitro*, adición de oligonucleótidos o modificaciones por medio de la reacción de polimerización en cadena (PCR). Por lo tanto, los componentes de la molécula recombinante antes de ser unidos pudieron estar sujetos a delecciones, inserciones o modificaciones internas. Como la molécula recombinante es derivada 20 de componentes que se originan de diferentes organismos y que han sido aislados, purificados o sintetizados, no es una molécula que existe como tal en la naturaleza.

Dependiendo del método de transformación utilizado para introducir la molécula recombinante a la célula vegetal de interés, puede ser necesario la inclusión de otras secuencias de ADN. Por ejemplo, es necesario incluir un vector 25 de clonación molecular que permita su replicación en *E. coli* y, para algunos casos, que permita la replicación *en A. tumefaciens*. También generalmente se incluye un gen de selección dominante que permita identificar y seleccionar la células que incorporaron de manera estable la molécula recombinante en su genoma.

30 La molécula recombinante puede ser introducida en la célula vegetal deseada por cualquier método de transformación genética de plantas, entre las cuales se puede incluir, pero no se limita, los siguientes métodos de transformación: el sistema de transformación mediado por el plásmido Ti de *Agrobacterium tumefaciens*, la electroporación, la microinyección y la biobalística 35 o bombardeo con micropartículas.

Para el uso del sistema de transformación genética mediada por el plásmido Ti de *Agrobacterium* para introducir la molécula recombinante en el genoma de la célula vegetal, es necesario incluir las secuencias bordes del T-DNA, de manera tal que estén presentes a ambos extremos del gen que codifica la enzima que sintetiza ácidos orgánicos y en algunos casos el gen de selección dominante. El uso de cepas de *Agrobacterium* desarmadas, es decir aquellas que se les han removido los genes responsables de la formación de tumores, pero que mantienen la capacidad de transferir ADN a células vegetales, permite la regeneración de plantas transgénicas que contienen la molécula recombinante de interés.

10 La molécula de ADN recombinante que contiene el gen que codifica para la síntesis de ácidos orgánicos puede ser introducido en cualquier especie vegetal, incluyendo tanto monocotiledóneas como dicotiledóneas. De especial interés, es introducir la molécula recombinante en especies vegetales que por naturaleza tienen una baja capacidad de solubilizar Fósforo y Fierro del suelo o que son susceptibles 15 a la toxicidad causada por el Aluminio. Ejemplos representativos de tales especies vegetales incluye pero no está limitada a maíz (*Zea mays*), arroz (*Oryza sativa*), trigo (*Triticum sp*), sorgo (*Sorghum bicolor*), soya (*Glycine max L.*), tabaco (*Nicotiana tabacum*), tomate (*Lycopersicum sculeatum*), papaya (*Carica papaya*) y papa (*Solanum tuberosum*).

20 Después de la transformación de los tejidos, las células vegetales o de los protoplastos derivados de la planta de interés, plantas transgénicas que contienen en su genoma la molécula recombinante son regeneradas. Estas plantas transgénicas son capaces de transferir de manera estable la molécula recombinante a su progenie, sea ésta derivada de semillas, esquejes, tubérculos o cualquier otra 25 estructura reproductiva.

Al crecer estas plantas en el campo, se podrá obtener una mayor productividad en aquellos suelos que tienen cantidades limitantes de nutrientes, en particular, pero no limitado a, Fósforo o Fierro. También se obtendrá una mejor producción en suelos ácidos donde se encuentran concentraciones tóxicas de 30 Aluminio. En los casos que se aplique Fósforo como parte de los fertilizantes, se obtendrá un ahorro en la cantidad de fertilizante necesaria para obtener una productividad óptima.

#### **Datos experimentales (Ejemplos)**

La presente invención será ilustrada en los ejemplos que se describen a 35 continuación, los cuales de ninguna manera se pretende que limiten la presente invención.

**Ejemplo 1****Expresión de la Citrato Sintasa de *Pseudomonas aeruginosa* en el citoplasma de plantas transgénicas de Tabaco.***1. Selección de genes a ser usados*

5 Para obtener plantas que sobreproducen ácidos orgánicos, genes que codifican para enzimas que tienen la capacidad de sintetizar ácidos orgánicos fueron seleccionados. Uno de estos genes, el gen de *Pseudomonas aeruginosa* que codifica la enzima Citrato Sintasa fue seleccionado (Donald et al (1989), J. Bacteriol. 171: 5542-5550). Esta enzima sintetiza ácido cítrico a partir de  
10 oxaloacetato y acetil-Coenzima A.

Para evitar que el ácido cítrico sintetizado por la Citrato Sintasa bacteriana, fuera convertido en otros de los componentes del ciclo de Krebs, se seleccionó al citoplasma como el compartimiento subcelular donde dicha enzima estaría localizada.

15

*2. Construcción de la molécula recombinante 35SCSb para la expresión de Citrato Sintasa de *Pseudomonas aeruginosa* en plantas**1. Construcción del vector de expresión pB2*

20 Para lograr la expresión de la secuencia codificante de la Citrato Sintasa de *Pseudomonas aeruginosa*, primero se procedió a construir el vector de expresión pB2. Para ello, la región del promotor fotoinducible (cab 80 de chícharo) del vector pGV1511 (Jofre-Garfias et al (1997), Plant Cell Reports 16: 847-852) delimitada por los sitios de restricción Hind III y Bam HI fue substituida por el  
25 fragmento Hind III - Bam HI del vector pBI 525 (Datla et al. (1993), Plant Science 94: 139-149.), que contiene al doble promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor, la región potenciadora del virus del mosaico de la alfalfa y el sitio de inicio de la traducción (como parte del sitio Neo I). La substitución de la región promocional del vector pGV1511 por la de pBI 525 se verificó mediante análisis de  
30 restricción doble empleando los sitios Xba I y Hind III.

*II. Construcción de la molécula recombinante p35SCSb*

La región que codifica Citrato Sintasa de *Pseudomonas aeruginosa* a partir del residuo aminoacídico número 9, correspondiente a la secuencia de gltA  
35 delimitada por los sitios de restricción Bcl I y Bam HI, fue movilizada desde el vector pPKB (Donald et al. (1989), J. Bacteriol. 171: 5542-5550) al sitio Bam HI

de pB2. La orientación del fragmento clonado se determinó por análisis del fragmento liberado por una doble restricción empleando las enzimas Xba I y Bam HI. Al clonar el fragmento Bcl I - Bam HI en la dirección correcta en pB2 la secuencia codificante de la citrato sintasa es modificada en sus 8 primeros residuos 5 aminoacídicos respecto al péptido nativo, pues la secuencia en pPKB codifica Met-Ala-Asp-Lys-Lys-Ala-Glu-Leu, en tanto que en p35SCSb se codifica para Met-Ala-Ser-Arg-Pro; el resto de la secuencia polipeptídica que codifican ambas construcciones es la misma. Para verificar el marco de lectura y la ausencia de modificaciones en la secuencia de la molécula recombinante p35SCSb, se 10 determinó la secuencia de 600 pares de bases a partir del sitio Xba I de p35SCSb por el método de Sanger. La figura 1 ilustra los pasos seguidos para la obtención de p35SCSb a partir de sus diferentes componentes.

3. *Obtención de plantas transgénicas que contiene en su genoma la 15 molécula recombinante 35SCSb*

El plásmido p35SCSb fue conjugado de *E. coli* a la cepa de *Agrobacterium* LB4404 (Hoekema A. et al. (1983), *Nature* 303, 179-180) usando el sistema de conjugación triparental que usa el plásmido asistente (heper plasmid) pRK2013 (Lam S.T. et al. (1985), *Plasmid* 13, 200-204). La molécula 20 recombinante fue introducida en el genoma de Tabaco (*Nicotiana tabacum* L. var. xanthii) usando el método de transformación de discos de hoja (Horsh R. B. et al (1985), *Science* 227, 1229-1232). Las plantas regeneradas, denominadas plantas CSb, fueron seleccionadas por su crecimiento en medio selectivo que contiene 50 microgramos de kanamicina por mililitro de medio de cultivo.

25

4. *Análisis de las plantas CSb*

Para confirmar que las plantas CSb contenían la molécula recombinante, ADN genómico fue extraído de las hojas de dichas plantas por métodos convencionales, digerido con las enzimas de restricción Hind III y Bam HI, 30 sometido a electrofóresis en un gel agarosa al 1% en buffer TBE, transferido a membranas de nylon e hibridizado con una sonda específica para el gen de la Citrato Sintasa de *Pseudomonas aeruginosa*. Encontrándose que la mayoría de las plantas resistentes a kanamicina contenían el cassette de expresión de la Citrato Sintasa de *P. aeruginosa*.

35 Para verificar que el cassette de expresión era funcionalmente transrito en las plantas CSb, ARN total de dichas plantas fue extraído usando técnicas

convencionales y sometido a un análisis de hibridación tipo Northern utilizando como sonda detectora un fragmento de AND correspondiente a la secuencia codificante de la Citrato Sintasa de *P. aeruginosa*. Se encontró que la mayoría de las plantas contenían niveles detectables de ARN mensajero correspondiente a la

5 Citrato Sintasa. Los niveles de ARN mensajero detectados para cada línea fueron variables como es normalmente encontrado en experimentos de transformación de plantas. Esta variación en los niveles de expresión de genes foráneos introducidos a plantas depende principalmente del sitio de inserción en el genoma de la planta blanco y que es conocido como el efecto de posición.

10 Se seleccionó la progenie T2 de plantas homocigotas con una copia de la molécula recombinante para análisis posteriores. No se observaron diferencias fenotípicas obvias entre las plantas que contienen el T-DNA p35SCSb y plantas control al ser crecidas bajo condiciones de invernadero, salvo que algunas plantas transgénicas producían más biomasa y una mayor cantidad de semillas.

15 El análisis bioquímico de líneas transgénicas CSb (Srere, P. (1969). Enzymol, 13:3-22) mostró que varias de ellas presentaban niveles elevados de actividad Citrato Sintasa respecto de las plantas control no transformadas. Se seleccionaron cuatro líneas con niveles de actividad Citrato Sintasa entre dos y tres veces mayores al control (ver figura 2).

20 La presencia de la CS bacteriana en las líneas CSb fue confirmada por análisis tipo Western empleando un antisuero (Donald, J.L, et al.. (1989.). Journal of Bacteriology, 5542-5550) que no reconoce a la enzima vegetal. El análisis densitométrico de la detección por análisis tipo Western de la CS bacteriana mostró una buena correlación entre el nivel de CS bacteriana y el

25 incremento detectado en la actividad Citrato Sintasa en las diferentes líneas CSb, demostrando que los niveles incrementados de Citrato Sintasa en las plantas CSb es debido a la expresión de la molécula recombinante que codifica la Citrato Sintasa de *P. aeruginosa*.

Para determinar si la expresión de la CS en el citoplasma de las células

30 vegetales ocasiona un incremento en el contenido de citrato, se analizaron extractos totales y de raíces de las líneas CSb mediante cromatografía líquida de alta presión y se compararon con los del control no transformado. Para determinar el contenido en los extractos de raíz, 1 gramo de tejido fue molido en nitrógeno líquido y extraído con 10 mililitros de etanol a punto de ebullición. El extracto fue

35 centrifugado a 1000 revoluciones por minuto por 10 minutos y el sobrenadante filtrado en un filtro milipore con un poro de 45 micras. El contenido de ácidos

orgánicos fue determinado de acuerdo a la técnica de Picha HD. (1985.). J.Agric.Food Chem. 33: 743-745. Se encontró que las líneas que expresan la construcción p35SCSb, presentan niveles de citrato en sus raíces hasta 10 veces mayores que las plantas control no transformadas (ver figura 3).

5 Se ha sugerido que la exudación, más que una acumulación intracelular de citrato, es probablemente la causa directa de la capacidad de ciertas plantas para poder disolver y utilizar compuestos insolubles de ciertos nutrientes o para tolerar la presencia de concentraciones tóxicas de ciertos compuestos como el Aluminio, por lo cual examinamos si un incremento en la síntesis de citrato en las plantas  
 10 CSb pudiese conducir a un incremento en su excreción. Para cuantificar el nivel de secreción de citrato en las raíces de las plantas CSb y control, 50 plántulas de cada fueron germinadas en medio semisólido y posteriormente transferidas a agua estéril por 12 horas; la cantidad de citrato exudada al agua fue determinada por el método de cromatografía de alta presión de Picha H. D. Se encontró que las  
 15 plantas de las líneas CSb seleccionadas tenían niveles de citrato exudado hasta 4 veces superior al de las plantas control (ver figura 3). La identidad química del compuesto que es exudado de manera incrementada en las líneas CSb se confirmó como citrato mediante técnicas convencionales de espectroscopía de masas.

20 **Ejemplo 2**

**Propiedades adquiridas por las plantas transgénicas que contienen en su genoma la molécula recombinante que codifica para la Citrato Sintasa de *Pseudomonas aeruginosa*.**

25 *1. Mayor eficiencia en la toma de disolución y toma de Fosfato*

Con la intención de simular las condiciones nutricionales que prevalecen en un suelo vertisol (cuyo impacto en la nutrición por Fosfato ya se ha descrito) decidimos emplear como sustrato un suelo compuesto por arena-limo en proporción 1:1 el cual registra un pH de 8.2. El nivel de fósforo es menor a 5ppm.

30 A este suelo se incorporaron dos tratamientos de Fósforo, utilizando como fuente el fosfato de Sodio ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ), a una concentración de 22 y 44 partes por millón (ppm). El fosfato de Sodio se incorporó al suelo en una sola aplicación al inicio del experimento. El fosfato de sodio es una fuente de Fósforo fácilmente asimilable por las plantas, pero del cual una parte importante se convierte en  
 35 formas insolubles no utilizables en las condiciones utilizadas.

El resto de los nutrientes necesarios para el crecimiento de las plantas se suministró en solución acuosa que se aplicó diariamente durante el transcurso del experimento que tuvo una duración de 6 meses.

El material vegetal utilizado consistió en dos líneas de plantas transgénicas 5 denominadas CSb 5-4 y CSb 5-18, que sobreexpresan el gen de la citrato sintasa de *P. aeuroginosa* y una planta silvestre (1522) que fue utilizada como control.

Las plantas se establecieron en bolsas de polietileno contenido 2 kilogramos de suelo con el tratamiento de Fósforo respectivo. Se diseñó un acomodo aleatorio de las plantas en el invernadero formando bloques al azar 10 consistiendo cada tratamiento de 24 repeticiones.

Con la intención de monitorear de una manera más estricta el desarrollo de las plantas se efectuaron muestreos en 3 etapas del desarrollo de la plantas: crecimiento vegetativo, floración y fructificación. De cada etapa se analizaron 8 plantas para medir las siguientes variables agronómicas: altura de la planta, área 15 foliar, peso fresco de la fronda, peso seco de la fronda, peso seco de la raíz. También se determinaron el número de flores (para la etapa de floración) y número y peso seco total de cápsulas o frutos (Para la etapa de fructificación).

El análisis de los datos obtenidos para cada uno de los tratamientos y cada una de las variables analizadas, reveló que existe una correlación entre ellas, es 20 decir que plantas con mayor altura tenían mayor área foliar y mayor peso seco. Debido a esta correlación y que el peso seco representa de manera más directa la cantidad de biomasa acumulada por cada línea en los diferentes tratamientos, en la 25 figura 4 se presentan solo los resultados obtenidos para este último parámetro en la última etapa de evaluación, el cuál representa el total de biomasa acumulada por la planta durante todo su ciclo de vida. El peso seco de las cápsulas, fronda y total se determinó de la siguiente manera:

a) Peso seco total de cápsulas (Incluye la biomasa acumulada en el total de frutos).

La colecta de las cápsulas se realizó en plena etapa de senescencia de la 30 planta, una vez que el llenado del grano había concluido. La cosecha se realizó cuidadosamente escindiendo las cápsulas desde la base del pedúnculo y depositándolas en bolsas de papel dextrasa. Las bolsas se etiquetaron adecuadamente y se incluyeron para el secado del material vegetal en una estufa Heraeus Baureihe 6000 a una temperatura de 70 grados centígrados durante 72 35 horas. El material seco se pesó en una balanza analítica Mettler PE 360 y los datos

obtenidos se sometieron a un análisis estadístico de varianza (anova) y de comparación de medias con el método de Tukey.

b) Peso seco de la fronda (Incluye la biomasa total de tallo y hojas).

Las hojas se cosecharon desde la base del peciolo y se incluyeron en 5 conjunto en bolsas de papel dextrasa. El tallo se escindió desde la corona (la zona del tallo más próxima al suelo). Todo el material proveniente de la misma planta se incluyó en una sola bolsa de papel debidamente etiquetada. Las muestras se secaron en una estufa Heraeus Baureihe 6000 a temperatura de 70 grados centígrados durante 72 horas. El material seco se pesó en una balanza analítica 10 Mettler PE 360 y los datos obtenidos se sometieron a un análisis estadístico de varianza (anova) y de comparación de medias con el método de Tukey.

c) Peso seco total de la planta ( incluye peso de la fronda y capsulas). Este parámetro se determinó sumando el peso total de la fronda y el peso total de las cápsulas.

15 El análisis estadístico reveló que las plantas transgénicas CSb 5-4 y 5-18 que expresan el gen de la citrato sintasa de *P. aeruginosa* acumulan un mayor peso seco total de las cápsulas que la planta control (1522) en el tratamiento de 22 partes por millón (ppm) de fósforo, ver figura 4. La diferencia es significativa con un intervalo de confianza del 95, siendo las plantas transgénicas las que 20 acumularon mayor biomasa.

En el tratamiento de 44 ppm, la línea transgénica B5 18 acumuló mayor biomasa que la transgénica CSb 5-4 y la planta control (1522). La diferencia en el peso seco de las cápsulas entre la línea CSb 5-18 y la control 1522 fue estadísticamente significativa, con un intervalo de confianza del 95% (ver figura 25 5).

El análisis del peso seco total de las plantas transgénicas CSb y plantas control, mostró que en los tratamientos de 22 y 44 ppm existe diferencia significativa entre las líneas de plantas evaluadas con un intervalo de confianza del 95 %. Se encontró que la línea transgénica CSb 5-18 acumuló mayor biomasa en 30 fronda que la línea transgénica CSb 5-4, y que ambas líneas transgénicas acumularon mayor biomasa en fronda que la planta control no transformada (ver figura 4 y 5).

El análisis del peso seco total de las plantas transgénicas CSb y la planta control, confirmó que las plantas transgénicas acumulan más biomasa que las 35 plantas control no transformadas: 1) en el tratamiento de 22 ppm, las dos líneas

transgénicas acumularon valores mayores de biomasa total que la planta control, siendo estas diferencias estadísticamente significativas; 2) En el tratamiento de 44 ppm, la planta transgénica CSb 5-18 acumuló significativamente más biomasa en peso seco total que la planta control, mientras que no se observó diferencias significativas entre el peso seco total de la línea CSb 5-4 y el control (ver figura 4).

Los resultados obtenidos demuestran que las plantas transgénicas, que tienen una capacidad incrementada de síntesis y exudación de ácidos orgánicos, acumulan más biomasa que sus contrapartes no transgénicas cuando son crecidas en condiciones de fósforo disponible limitante. También es importante señalar que 10 la línea CSb 5-18 que exuda más ácidos orgánicos que la CSb 5-4, produjo en ambas condiciones más biomasa, lo que comprueba que la capacidad de exudación de ácidos orgánicos tiene una correlación directa con el crecimiento y acumulación de biomasa en condiciones limitantes de fósforo disponible. También es importante señalar que la biomasa acumulada por las plantas CSb 5-18 en el 15 tratamiento donde se suplementó con 22 ppm de fósforo, fue igual o superior a la biomasa acumulada por las plantas control crecidas a 44 ppm de fósforo (ver figura 6). Esto demuestra que con una aplicación de la mitad del fertilizante fosfórico, la planta transgénica CSb 5-18 puede acumular tanta o más biomasa que una planta control no transformada crecida en el doble de fertilizante.

20

*2. Tolerancia de las plantas de Tabaco que contienen niveles incrementados de síntesis, acumulación y exudación de citrato a niveles tóxicos de aluminio a pH ácido.*

Debido a que la evidencia del papel de la excreción de citrato en la 25 tolerancia al aluminio es indirecta, fué necesario determinar si las líneas CSb con niveles elevados de síntesis y excreción de citrato eran más tolerantes que las plantas control a concentraciones fitotóxicas de aluminio. Dado que el crecimiento de la raíz se ha demostrado que correlaciona con la tolerancia al aluminio, cuantificamos el efecto que concentraciones crecientes de aluminio tienen sobre el 30 crecimiento de la raíz en las líneas CSb de Tabaco.

Para evaluar el efecto del aluminio en el crecimiento de las raíces se utilizó la técnica de transferencia vertical (Taiz L and Murphy, A. (1995.). Plant Physiology. 108: 29-38.). Esta técnica permite establecer el efecto tóxico sobre el desarrollo de la raíz por compuestos adicionados a la solución nutritiva, desde el 35 momento mismo de su aplicación.

En nuestros experimentos se germinaron 100 semillas de la progenie T2 de CSb homocigotas y plantas control sobre placas cubiertas con papel filtro y humectadas por capilaridad con solución nutritiva Blaydes a pH 4.3. A los 7 días de germinación se rotan las placas que contienen las plántulas en 90 grados y la 5 solución nutritiva es reemplazada por solución nutritiva adicionada con aluminio y con pH ajustado a 4.3. Después de 7 días de crecer en presencia de aluminio, tiempo durante el cual se monitoreo diariamente el pH, el cual se encontró no cambiar en más de 0.2 unidades, se cuantificó la longitud de la raíz para cada línea. Se observó que la inhibición del crecimiento de la raíz, al incrementar la 10 concentración del aluminio, es significativamente menor en las líneas CSb respecto a la línea control. El análisis estadístico utilizando la contrastación de un sólo grado de libertad del análisis combinado de varianza (ANOVA) de dos experimentos independientes indicó diferencias significativas entre el control y las líneas CSb en todas las concentraciones evaluadas ( $P < 0.0001$ ), con la excepción de 15  $50\mu\text{M}$ , para la cual no se obtuvo diferencia significativa (ver figura 5).

Para evaluar si la sobreproducción de citrato también tenía un efecto en el desarrollo de la raíz de semillas germinadas directamente en medio contenido aluminio (a pH 4.3), se germinaron semillas del control y líneas CSb en medio con aluminio en concentraciones de 0.1 a  $1\mu\text{M}$ . Se observó que en 20 concentraciones mayores a  $300\mu\text{M}$ , las semillas control germinaron pero no desarrollaron sistema radical. La inspección en detalle de las raíces de las plantas control germinadas en medio contenido aluminio mostró que en bajas concentraciones ( $50-75\mu\text{M}$ ) de este elemento tóxico tenía solo un efecto ligero en el desarrollo longitudinal de la raíz, pero inhibía severamente el desarrollo de pelos 25 radiculares, y que, en concentraciones mayores a  $300\mu\text{M}$  se detiene completamente el crecimiento de la raíz y el desarrollo de pelos radiculares. Cuando las líneas CSb se germinaron en medio contenido aluminio, se observó 30 que tanto el crecimiento de la raíz y el desarrollo de los pelos radiculares fue alterado en menor grado por niveles tóxicos de aluminio que los controles y que el aspecto de la raíz para cada línea CSb, en presencia de concentraciones tóxicas de aluminio, correlaciona con su actividad CS y nivel de citrato determinados previamente.

Para corroborar que el fenotipo de tolerancia a aluminio es debido a la presencia del trasgen 35S-CSb en el genoma de las líneas transgénicas de tabaco, 35 el patrón de segregación de tolerancia a aluminio fue examinado en la progenie T1 de las líneas seleccionadas. Se observó una segregación de fenotipos

tolerantes/susceptibles con un patrón 3:1 en las líneas que contienen inserciones sencillas, y que la tolerancia a Aluminio consegresa con el gen de resistencia a kanamicina presente en el T-DNA del vector binario empleado para la producción de líneas CSb, confirmando que el fenotipo de resistencia se debe a la presencia 5 de la construcción 35S-CSb en el genoma de las líneas transgénicas de Tabaco analizadas.

### Ejemplo 3

#### Aplicabilidad general de la tecnología

##### 1. Aplicación a diferentes especies vegetales

10 Para demostrar que la invención es aplicable a otras especies vegetales diferentes al Tabaco, el T-DNA contenido en la molécula recombinante p35S-CSb fue introducido al genoma de plantas de Papaya mediante el sistema de transformación por bombardeo de partículas (Cabrera-Ponce et al. (1995), Plant Cell Reports 15: 1-7). Tal como se observó previamente para Tabaco, se encontró 15 que las líneas de Papaya presentaron niveles de actividad Citrato Sintasa 2 a 3 veces mayores que los controles transformados con el vector sin la secuencia codificante para CS. Para probar el nivel de tolerancia a aluminio en las líneas CSb de Papaya, se transfirieron 20 plantas regeneradas de cada línea a medio de enraizamiento contenido diferentes concentraciones de aluminio. Se encontró 20 que el desarrollo de la raíz fue inhibido completamente en las plantas control expuestas a concentraciones de 50  $\mu$ M aluminio o mayores, siendo así la Papaya más sensible a la toxicidad por aluminio que el Tabaco. Bajo estas condiciones las plantas control no sólo no formaron raíces, sino que fueron incapaces de formar hojas nuevas o de expandir las existentes. En contraste, se encontró que las líneas 25 CSb de Papaya fueron capaces de formar raíces y crecer normalmente en concentraciones de aluminio hasta de 300  $\mu$ M.

#### Breve descripción de las figuras

Figura 1. Muestra la construcción de p35SCSb. Se indica también la 30 secuencia nucleotídica y de aminoácidos en el sitio de la iniciación de la traducción del gen original de la CS de *Pseudomonas aeruginosa* (pPKB), la del vector de expresión pB2 y la secuencia resultante en p35SCSb, resultado de la clonación del fragmento Bcl I-Bam HI que contiene la mayor parte de la secuencia codificante de la CS en el vector de expresión pB2.

35 Figura 2. Determinación de la actividad de citrato sintasa presente en extractos de plantas transgénicas CSb y plantas control 1522. Se puede observar

que las plantas transgénicas tienen una actividad de citrato sintasa aumentada con respecto del control.

Figura 3. Determinación de los niveles de citrato presentes en extractos de raíz de plantas transgénicas CSb y plantas control. También se presenta el nivel de citrato exudado por las plantas transgénicas CSb y las plantas control. Se puede observar que las plantas transgénicas tienen una capacidad incrementada de acumular y exudar ácido cítrico con respecto a las plantas control.

Figura 4. Determinación de la biomasa acumulada por plantas transgénicas de tabaco que sobreexpresan el gen de la citrato sintasa de *Pseudomonas aeruginosa* (CSb 5-4 y CSb 5-18) y plantas control (1522) crecidas en presencia de 22 partes por millón de fósforo. La biomasa acumulada se presenta como peso seco de capsulas, fronda y capsulas + fronda. Los resultados presentados son el promedio y error standar de ocho repeticiones por tratamiento. El análisis estadístico (ANOVA y prueba de Tukey), reveló que existe un aumento en el rendimiento en las plantas transgénicas comparado con las plantas control en las concentraciones de fósforo que se probaron.

Figura 5. Determinación de la biomasa acumulada por plantas transgénicas de tabaco que sobreexpresan el gen de la citrato sintasa de *Pseudomonas aeruginosa* (CSb 5-4 y CSb 5-18) y plantas control (1522) crecidas en presencia de 44 partes por millón de fósforo. La biomasa acumulada se presenta como peso seco de cápsulas, fronda y cápsulas + fronda. Los resultados presentados son el promedio y error standar de ocho repeticiones por tratamiento. El análisis estadístico (ANOVA y prueba de Tukey), reveló que existe un aumento en el rendimiento en las plantas transgénicas comparado con las plantas control en las concentraciones de fósforo que se probaron.

Figura 6. Comparación de la biomasa total producida por las plantas transgénicas CSb 5-18 y las plantas control, crecidas a 22 y 44 partes por millón de fósforo.

Figura 7. Determinación del efecto de concentraciones crecientes de aluminio a pH 4.5 sobre el crecimiento de la raíz de plantas transgénicas CSb y plantas control. El efecto está graficado como el porcentaje de inhibición del crecimiento de la raíz en presencia de aluminio con respecto al crecimiento de las mismas plantas en ausencia de aluminio. Se puede observar que las raíces de las plantas transgénicas CSb crecen mejor en presencia de concentraciones tóxicas de aluminio.

## REIVINDICACIONES

5 1. Método para la obtención de plantas transgénicas que tienen una capacidad aumentada de sintetizar, acumular y exudar ácidos orgánicos, por integración a su genoma de una molécula de ADN recombinante heteróloga, que codifica para enzimas que sintetizan ácidos orgánicos, que comprende los siguientes pasos:

10

a) La preparación de una molécula de ADN recombinante heteróloga que comprende uno o más genes que codifican para enzimas que sintetizan ácidos orgánicos, funcionalmente ligadas a una secuencia promotora de la transcripción funcional en plantas, y a una secuencia terminadora de la transcripción funcional en plantas.

15

b) La transformación de células vegetales con la molécula de ADN recombinante y

20

c) La regeneración de plantas transgénicas a partir de células transformadas, o de semillas de plantas obtenidas de dichas células transformadas, por una o varias generaciones, donde la información genética de dichas células transformadas, incluye la molécula de ADN recombinante que codifica para enzimas que sintetizan ácidos orgánicos.

25

2. El método de la reivindicación 1 donde la molécula de ADN recombinante comprende uno o más genes microbianos que codifican para una enzima que sintetiza ácidos orgánicos.

30

3. El método de la reivindicación 1 donde la molécula de ADN recombinante comprende un gen de origen vegetal que codifica para una enzima que sintetiza ácidos orgánicos.

35

4. El método de la reivindicación 1 donde la molécula de ADN recombinante comprende un gen de origen animal que codifica para una enzima que sintetiza ácidos orgánicos.

35

5. El método de la reivindicación 2 donde la molécula de ADN recombinante comprende uno o más gene bacterianos que codifican para una enzima que sintetiza ácidos orgánicos.
- 5 6. El método de la reivindicación 1 donde la molécula recombinante comprende un gen que codifica para la enzima Citrato Sintasa.
7. El método de la reivindicación 1 donde la molécula recombinante comprende un gen que codifica para la enzima Malato Deshidrogenasa.
- 10 8. El método de la reivindicación 1 donde la enzima que sintetiza ácidos orgánicos o se localiza en el citoplasma..
9. El método de la reivindicación 1 donde la enzima que sintetiza ácidos orgánicos se localiza en cloroplasto.
- 15 10. El método de la reivindicación 1 donde la enzima que sintetiza ácidos orgánicos se localiza en la mitocondria.
- 20 11. El método de la reivindicación 5 donde la molécula recombinante comprende un gen de *Pseudomonas aeruginosa* que codifica la Citrato Sintasa.
12. El método de las reivindicaciones 1-10 donde el terminador de la transcripción es el terminador de la transcripción del gen de la Nopalina Sintetasa.
- 25 13. El método de las reivindicaciones 1-10 donde el promotor es un promotor constitutivo.
14. El método de las reivindicaciones 1-10 donde el promotor es un promotor específico de raíces.
- 30 15. El método de las reivindicaciones 1-10 donde el promotor es un promotor inducible por estrés causado por baja disponibilidad de Fosfato.
- 35 16. El método de las reivindicaciones 1-10 donde el promotor es un promotor inducible por estrés causado por baja disponibilidad de Fierro.

17. El método de las reivindicaciones 1-10 donde el promotor es el promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor.

5 18. El método de las reivindicaciones 9 y 10 donde la molécula recombinante comprende una secuencia de peptido señal para dirigir una enzima heteróloga que sintetiza ácidos orgánicos al cloroplasto o la mitocondria de las células transgénicas.

10 19. Una molécula de ADN recombinante heteróloga que comprende uno o más genes que codifican para enzimas que sintetizan ácidos orgánicos, funcionalmente ligadas a una secuencia promotora de la transcripción funcional en plantas, y a una secuencia terminadora de la transcripción funcional en plantas.

15 20. La molécula de ADN recombinante de la reivindicación 19, donde el gen que codifica para la enzima que sintetiza ácidos orgánicos, es uno o más genes microbianos.

20 21. La molécula de ADN recombinante de la reivindicación 19, donde el gen que codifica para la enzima que sintetiza ácidos orgánicos es un gen de origen vegetal.

25 22. La molécula de ADN recombinante de la reivindicación 19, donde el gen que codifica para la enzima que sintetiza ácidos orgánicos es un gen de origen animal.

30 23. La molécula de ADN recombinante de la reivindicación 19, donde el gen que codifica para la enzima que sintetiza ácidos orgánicos es uno o más genes bacterianos.

35 24. La molécula de ADN recombinante de la reivindicación 19, donde el gen que codifica para la enzima que sintetiza ácidos orgánicos es un gen que codifica para la enzima citrato sintasa.

25. La molécula de ADN recombinante de la reivindicación 19, donde el gen que codifica para la enzima que sintetiza ácidos orgánicos es un gen de *Pseudomonas aeruginosa* que codifica para la enzima citrato sintasa.

5 26. La molécula de ADN recombinante de la reivindicación 19, donde el gen que codifica para la enzima que sintetiza ácidos orgánicos es un gen que codifica para la enzima Malato Deshirogenasa.

10 27. La molécula de ADN recombinante de la reivindicación 19, donde el gen que codifica para la enzima que sintetiza ácidos organicos es un enzima que se localiza en el citoplasma.

15 28. La molécula de ADN recombinante de la reivindicación 19, donde el gen que codifica para la enzima que sintetiza ácidos organicos es un enzima que se localiza en cloroplasto.

29. La molécula de ADN recombinante de la reivindicación 19, donde el promotor es un promotor es un promotor constitutivo.

20 30. La molécula de ADN recombinante de la reivindicación 19, donde el promotor es un promotor es un promotor específico de raíces.

31. La molécula de ADN recombinante de la reivindicación 19, donde el promotor es un promotor es un promotor inducible por estrés causado por baja disponibilidad de Fosfato.

25

32. La molécula de ADN recombinante de la reivindicación 19, donde el promotor es un promotor es un promotor inducible por estrés causado por baja disponibilidad de Fierro.

30

33. La molécula de ADN recombinante de la reivindicación 19, donde el promotor es un promotor es el promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor.

34. La molécula de ADN recombinante de la reivindicación 19, que comprende una secuencia que codifica un péptido de tránsito para cloroplasto o mitocondria funcional en plantas.

5

35. La molécula de ADN recombinante de la reivindicación 19, que comprende una secuencia que codifica para un terminador de la transcripción que es el terminador de la transcripción del gen de la Nopalina Sintetasa.

10 36. La molécula de ADN recombinante de la reivindicación 19, como se define en la figura 1.

37. El vector que comprende la molécula de ADN recombinante de la reivindicación 19.

15

38. Plantas transgénicas con capacidad incrementada de sintetizar, acumular y exudar ácidos orgánicos por integración a su genoma de una molécula de ADN recombinante heteróloga como se define en cualquiera de las reivindicaciones 19 a 36.

20

39. Las plantas transgénicas de la reivindicación 38 que son tolerantes a concentraciones tóxicas de Aluminio.

25

40. Las plantas transgénicas de la reivindicación 38 que tienen capacidad incrementada para solubilizar o acumular Fosfato.

41. Las plantas transgénicas de la reivindicación 38 que tienen capacidad incrementada para solubilizar o acumular Fierro.

30 42. Las plantas transgénicas de la reivindicación 38 que requiere menos fertilizante para su crecimiento.

43. Las plantas transgénicas de la reivindicación 38 que se desarrollan mejor o tiene mayor productividad en suelos ácidos.

35

44. Las plantas transgénicas de la reivindicación 38, donde la planta es una monocotiledónea

45. Plantas transgénicas de la reivindicación 38, donde la planta es una dicotiledónea

46. Plantas transgénicas de la reivindicación 44, donde la planta pertenece a cualquiera de las familias: *Poaceae* ó *Liliaceae*.

10 47. Plantas transgénicas de la reivindicación 45, donde la planta pertenece a cualquiera de las familias: *Leguminosae*, *Solenaceae*, *Caricaceae* ó *Cucurbitaceae*.

15 48. Plantas transgénicas de la reivindicación 44, donde la planta pertenece a cualquiera de la especies: *Triticum spp*, *Oryza sativa*, *Zea mays*, *Sorghum bicolor*, *Avena sativa* ó *Saccharum officcianarum*.

20 49. Plantas transgénicas de la reivindicación 45, donde la planta pertenece a cualquiera de las especies: *Solanum tuberosum*, *Lycopersicum sculentum* ó *Glycine max*.

50. Plantas transgénicas de la reivindicación 45, donde la planta es del género *Nicotiana*

25 51. Plantas transgénicas de la reivindicación 50, donde la planta es de la especie *Nicotiana tabacum*.

52. Plantas transgénicas de la reivindicación 45, donde la planta es del género *Carica*.

30 53. Plantas transgénicas de la reivindicación 52, donde la planta es de la especie *Carica papaya*.

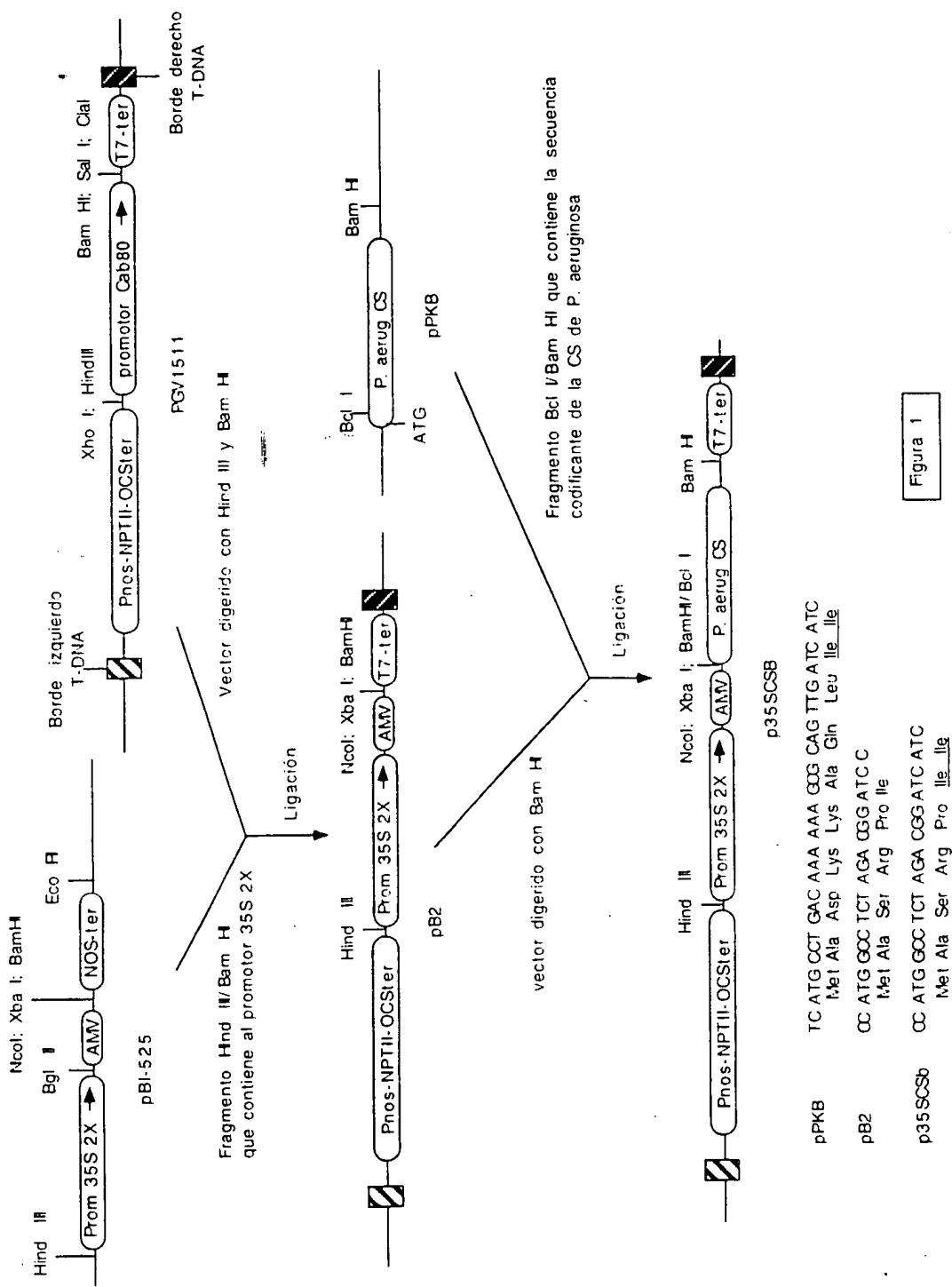
54. El uso de las plantas transgénicas de la reivindicación 26 en suelos ácidos.

55. El uso de las plantas transgénicas de la reivindicación 26 en suelos que contengan fosfatos en formas no disponibles para la nutrición vegetal.

56. El uso de las plantas transgénicas de la reivindicación 26 para prácticas o sistemas de cultivo que usen menos fertilizante.

57. Las semillas transgénicas obtenibles de una planta transgénica como se define en la reivindicación 26.

10 58. Una célula transformada o protoplasto transformado con la molécula de ADN recombinante como se define en cualquiera de las reivindicaciones 19 a 36.



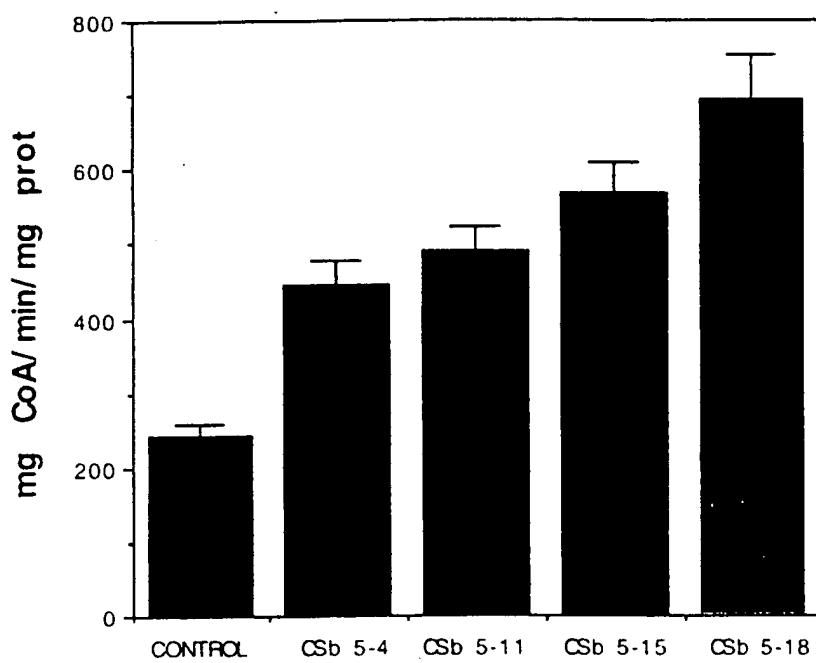


Figura 2

Linea	Nivel de citrato en extractos de raíz (mM/g peso fresco)	Nivel de exudación de citrato (nM/plantula/h)
Control	0.43±0.05	67± 7.2
CSb 5-4	1.41±0.07	105±12.2
CSb 5-11	1.62±0.08	111±12.6
CSb 5-15	2.31±0.10	163±14.3
Csb 5-18	4.47±0.35	231±15.3

Figura 3

Linea	Peso seco de capsulas (gramos)	Peso seco de fronda (gramos)	Peso seco total (gramos)
1522	3.87 ± 0.27	9.22 ± 0.42	13.1 ± 0.55
CSb 5-4	4.41 ± 0.28	9.87 ± 0.41	14.3 ± 0.56
CSb 5-18	5.13 ± 0.30	11.60 ± 0.43	16.8 ± 0.61

Figura 4

Linea	Peso seco de capsulas (gramos)	Peso seco de fronda (gramos)	Peso seco total (gramos)
1522	5.48 ± 0.29	10.30 ± 0.43	15.8 ± 0.55
CSb 5-4	5.59 ± 0.30	10.60 ± 0.41	16.1 ± 0.53
CSb 5-18	6.13 ± 0.31	11.20 ± 0.44	17.5 ± 0.54

Figura 5

Linea	Peso seco total (gramos)	
	22 ppm fosforo	44 ppm fosforo
1522 CSB 5-18	13.1 ± 0.55 16.8 ± 0.61	15.8 ± 0.55 17.5 ± 0.54

Figura 6

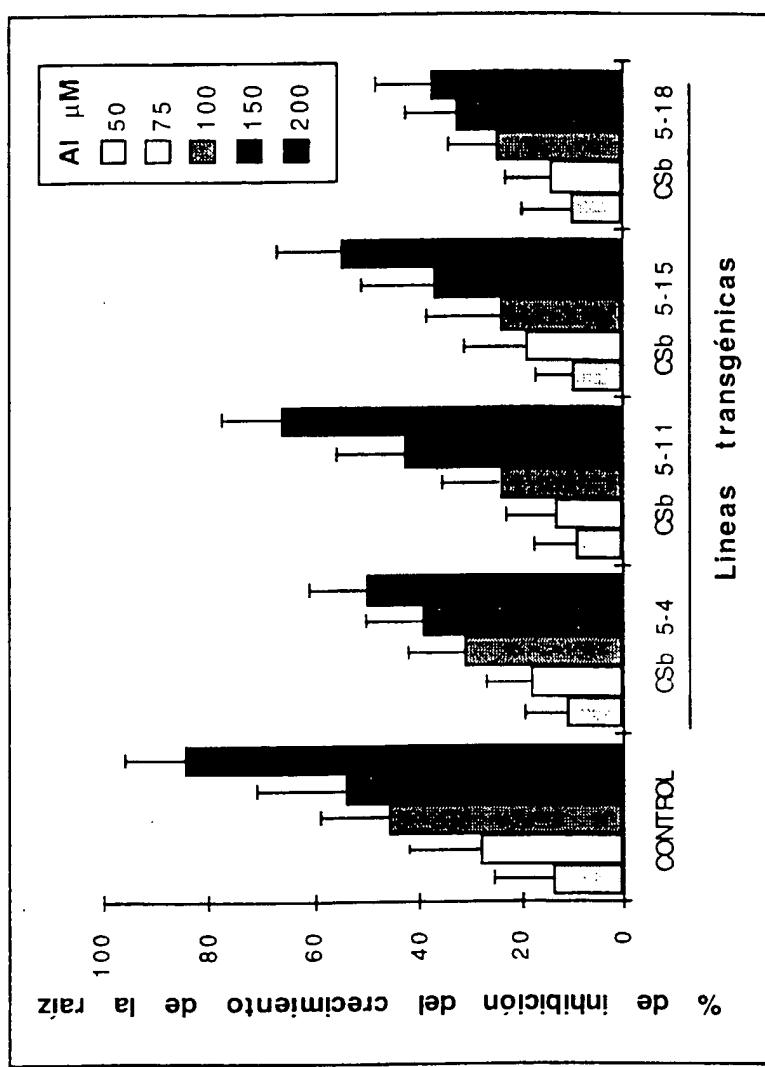


Figura 7

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/MX97/00020

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC(6) :C12N 15/82, 5/04; A01H 5/00, 5/10, 4/00; C12P 21/06  
US CL :536/23.1, 23.7; 435/69.1, 410, 418, 419; 800/278

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

U.S. : 536/23.1, 23.7; 435/69.1, 410, 418, 419; 800/278

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

MEDLINE, AGRICOLA, BIOSIS, APS, WIPDS

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	DE LA FUENTE et al. Aluminium Tolerance in Transgenic Plants by Alteration of Citrate Synthesis. Science. 06 June 1997, Vol. 276, No. 5318, pages 1566-1568, see entire content.	1-6, 8-21, 23-25, 27-29, 35-43, 45, 53
Y	DONALD et al. Cloning, Sequencing, and Expression of the Gene for NADH-Sensitive Citrate Synthase of Pseudomonas Ae ruginosa. J. Bacteriol. October 1989, Vol. 171, No. 10, pages 5542-5550, see entire content.	1-58

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

•	Special categories of cited documents:	"T"	later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
•A*	document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X"	document of particular relevance, the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
•B*	earlier document published on or after the international filing date	"Y"	document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
•L*	document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&"	document member of the same patent family
•O*	document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means		
•P*	document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		

Date of the actual completion of the international search

29 APRIL 1999

Date of mailing of the international search report

02 JUL 1999

Name and mailing address of the ISA/US  
Commissioner of Patents and Trademarks  
Box PCT  
Washington, D.C. 20231

Faxsimile No. (703) 305-3230

Authorized officer  
T. Lawrence  
OUSAMA M-FAIZ ZAGHMOUD *Yen*

Telephone No. (703) 308-0196